ÜBER DIE STUFENPHOTOMETRISCHE BESTIMMUNG DES KREATININS IM PLASMA UND URIN MIT HILFE DER m-DINITROBENZOESÄURE

INAUGURALDISSERTATION

ZUR ERLANGUNG DER WÜRDE
EINES DOCTOR MEDICINAE DER
UNIVERSITÄT BERN

VORGELEGT VON
FRANZ WYSS VON SOLOTHURN.

BUCHDRUCKEREI WILDI, WANGEN b. O.

AUS DER MEDIZINISCHEN KLINIK DER UNIVERSITÄT BERN
DIREKTOR PROF. DR. W. FREY.

ÜBER DIE STUFENPHOTOMETRISCHE BESTIMMUNG DES KREATININS IM PLASMA UND URIN MIT HILFE DER m-DINITROBENZOESÄURE

INAUGURALDISSERTATION
ZUR ERLANGUNG DER WÜRDE
EINES DOCTOR MEDICINAE DER
UNIVERSITÄT BERN

VORGELEGT VON
FRANZ WYSS VON SOLOTHURN

AUF ANTRAG DES HERRN PROF. DR. FREY
VON DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT ZUM
DRUCK ALS DISSERTATION GENEHMIGT.

BERN, 10. Februar 1943.

DER DEKAN DER MED. FAKULTÄT
PROF. DR. A. v. MURALT.

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Inhaltsverzeichnis.

Einleitung . . . . . Seite 4
Eigene Untersuchungen . . . . . „ 6

I. Versuche mit Kreatininlösungen
A. Prinzip der Reaktion . . . . . „ 6
B. Wahl des Filters . . . . . „ 6
C. Wahl der Schichtdicke . . . . . „ 7
D. Feststellung der optimalen Reaktionsbedingungen . . . . . „ 7
E. Störungsfaktoren . . . . . „ 8
F. Eichkurve . . . . . „ 10

II. Versuche mit Urin . . . . . „ 11
A. Prinzipielles . . . . . „ 11
B. Zusatzversuche . . . . . „ 12
C. Vorbehandlung des Urins . . . . . „ 12

III. Versuche mit Blut . . . . . „ 14
A. Prinzipielles . . . . . „ 14
B. Enteiweissung des Plasmas . . . . . „ 14
C. Einstellung auf ein bestimmtes pH . . . . . „ 15
D. Zusatzversuche . . . . . „ 16

IV. Praktische Ausführung der Kreatininbestimmung im Blut und Urin . . . . . „ 16
A. Bestimmung im Blute . . . . . „ 16
B. Bestimmung im Urin . . . . . „ 18

V. Beispiele für Kreatinin-Clearance-Werte bei normalen und subakuten Nephritiden . . . . . „ 19
Zusammenfassung . . . . . „ 20
Literatur . . . . . „ 20

Ueber die stufenphotometrische Bestimmung des Kreatinins in Plasma und Urin mit Hilfe der m-Dinitrobenzoesäure.

Einleitung:

Die quantitative Messung der Kreatininausscheidung im Urin ist Gegenstand verschiedener wissenschaftlicher Fragestellungen. So stellt bekanntlich das Kreatinin das Endprodukt des Kreatin-Stoffwechsels dar, und ausserdem ist eine Kreatinbestimmung nur durch eine Ueberführung desselben in Kreatinin möglich. Störungen des Kreatinin-Stoffwechsels werden nun bei verschiedenen Krankheitszuständen angetroffen. Einmal können sie innersekretorisch bedingt sein, wie beim Diabetes und bei der Hyperthyreose, andererseits kommen sie auch bei den verschiedenen Formen von Muskeldystrophie und den Myotonien vor.

Das Kreatinin beansprucht aber unser Interesse noch in ganz anderer Richtung, nämlich auf dem Gebiete der Nieren-Physiologie. Die Forschungsarbeit auf diesem Gebiete bewegt sich ja dahin, die durch die Morphologie dieses Organs aufgezwungene Zweiteilung in Glomerulus- und Tubulusapparat auch funktionell zu erfassen. Der von LUDWIG eingeführten und später von CUSHNY und RICHARDS gefestigten Filtrations- und Rückresorptionstheorie steht die HAIDENHAIN'sche Sekretionstheorie gegenüber. Beim Kaltblüter ist dieser Streit durch RICHARDS zugunsten der ersten Theorie entschieden worden. Man begnügte sich jedoch nicht damit, sondern suchte nun nach Substanzen, die nur der glomerulären Filtration, nicht aber der tubulären Rückresorption unterliegen. VAN SLYKE glaubte, dies treffe für den Harnstoff zu, und begründete aus dieser Annahme heraus den Begriff der Harnstoff-Clearance. Darunter versteht man diejenige Anzahl ccm Plasma, die pro Minute von ihrem

Harnstoffgehalt befreit wird. Man erhält diesen Wert, indem man den pro Minute absolut ausgeschiedenen Harnstoffwert durch den Harnsfoffgehalt des Plasmas dividiert. Eine solche Clearence kann nun für jede Urinsubstanz errechnet werden, sofern die zeitlich einander entsprechenden Plasma- bzw. Urinwerte bestimmt werden können. Die Formel für die Kreatinin-Clearance lautet also:

$$\text{Clearance} = \frac{K_2}{K_1} \times \text{U/min.}$$

K_1 = Kreatininkonzentration im Blut
K_2 = Kreatininkonzentration im Urin
U/min. = ausgeschiedener Urin pro Minute.

Die erhaltenen Werte sind jedoch sehr verschieden, und dies muss als Folge einer ungleichmässigen Rückresorption der verschiedenen Urinsubstanzen durch die Tubuli angesehen werden. Sollte sich nun aber tatsächlich eine Substanz finden, die von den Tubuli weder rückresorbiert noch sezerniert, von den Glomeruli dagegen filtriert wird, so muss die entsprechende Clearance gleich gross sein wie das Glomerulusfiltrat. Man hätte es dann in der Hand, die Filtrations- und Rückresorptionstätigkeit der Niere genau zu erfassen. Da nun die Kreatinin-Clearance diejenige des Harnstoffs stets übertrifft, so lag die Annahme sehr nahe, dass es sich bei der Kreatinin-Clearance um das Glomerulusfiltrat handele. REHBERG ging sogar soweit, durch parenterale Einverleibung einer Kreatininlösung den Plasmakreatininwert auf besser messbare Werte zu erhöhen, um auf diese Weise die Kreatinin-Clearance leichter bestimmen zu können. Diese Tatsachen beweisen auf alle Fälle, dass der Kreatininbestimmung im Plasma und Urin eine erhebliche Bedeutung zukommt.

Leider sind nun die meisten bisher durchgeführten Kreatininbestimmungen mit der kolorimetrischen Bestimmungsmethode nach FOLIN gemacht worden, die sich auf der JAFFÉschen Pikrinsäure-Reaktion aufbaut. Diese Farbreaktion ist aber nicht streng spezifisch und ausserdem relativ unempfindlich. Man versteht aus diesem Grunde auch das REHBERGsche Vorgehen. Es bedeutete deshalb einen großen

Fortschritt, als LANGLEY und EVANS zur Anwendung der viel spezifischer reagierenden Dinitrobenzoate übergingen. KOMM und LEINBROCK ist es dann gelungen, mit Hilfe der m-Dinitrobenzoesäure ein für die Klinik geeignetes kolorimetrisches Verfahren auszubauen.

Unsere Untersuchungen verfolgen nun den Zweck, die von KOMM und LEINBROCK entwickelte kolorimetrische Bestimmung auf das Zeiss'sche Stufenphotometer zu übertragen und damit die ganze Kreatininbestimmung auf eine sichere Grundlage zu stellen.

Eigene Untersuchungen.

I. Versuche mit Kreatininlösungen.

A. Prinzip der Reaktion. Als Grundlage diente die von KOMM und LEINBROCK angegebene Reaktion mit 2% m-Dinitrobenzoesäure in 96% Alkohol und 10% NaOH, welche mit Kreatininlösungen eine rote Farbe geben. Wir verwendeten für alle Versuche die von oben genannten Autoren verlangten Mengenverhältnisse: 1 Teil 2% m-Dinitrobenzoesäure, 1 Teil 10% NaOH und 2 Teile Kreatinin-haltige Lösung. Für die Vorversuche verwendeten wir eine vom chem. Institut Bern hergestellte m-Dinitrobenzoesäure vom Schmelzpunkt 206° [1]). LANGLEY und EVANS verlangen auch möglichst reine m-Dinitrobenzoesäure, da von deren Reinheit der Erfolg abhänge. (HEINSBERG und LANG verlangen einen Schmelzpunkt von 204—205°). Somit dürfte unser Reagens diese Forderung weitgehend erfüllen.

B. Wahl des Filters. Das Zeiss-Pulfrich-Photometer ist mit einer Serie von Farbfiltern ausgestattet, von welchen jeder einzelne nur Licht von einem bestimmten Wellenbereiche durchlässt. Um genaue Werte zu erhalten, ist es notwendig, jenes Filter auszuwählen, welches von der von uns erhaltenen Farbe ein Maximum absorbiert. In unserem Apparat standen

[1]) Herrn Dr. Nitschmann vom chem. Institut sei an dieser Stelle für die freundliche Herstellung der m-Dinitrobenzoesäure und für wertvolle Ratschläge mein Dank ausgesprochen.

9 Filter von λ 543 bis λ 575 zur Verfügung. Mittels einer 5 mg % Kreatininlösung wurde das Filter mit maximaler Absorption ermittelt. Die Werte sind in folgender Tabelle zusammengestellt:

Filter No. 1	s 543	D = 28.3 %	E = 0.549	
Filter No. 2	s 545	D = 25.0 %	E = 0.602	
Filter No. 3	s 550	D = 24.8 %	E = 0.606	
Filter No. 4	s 553	D = 53.0 %	E = 0.456	D = Lichtdurchlässigkeit
Filter No. 5	s 557	D = 53.3 %	E = 0.272	E = Extinktion
Filter No. 6	s 561	D = 76.3 %	E = 0.119	
Filter No. 7	s 566	D = 86.0 %	E = 0.066	
Filter No. 8	s 572	D = 90.0 %	E = 0.046	
Filter No. 9	s 575	D = 96.5 %	E = 0.018	

Kurvenmäßig zusammengestellt ist klar ersichtlich, dass das Grünfilter s3 mit λ 550 die grösste Absorption aufweist. Dieses Filter wurde denn auch für alle weiteren Untersuchungen verwendet.

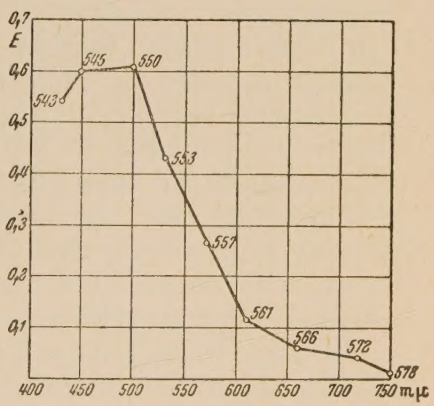

Abb. 1. Spektrale Extinktion einer Kreatininlösung von 5 mg %. (E Extinktion = Logarithmus der Absorption, Abszisse in mμ = Wellenlänge, s 543 usw. = Spektralfilter des Stufenphotometers.)

C. Wahl der Schichtdicke.

Für alle Versuche wurde beim Photometrieren eine Cuvette von der Schichtdicke 5 cm verwendet, da es sich bei Vorversuchen zeigte, daß Kreatininkonzentrationen von 0,5 mg % (wie sie bei unseren Bestimmungen sehr häufig sein werden) bei dieser Schichtdicke noch in gut ablesbarem Bereiche sind. (Durchlässigkeitswerte von über 80 % und unter 10 % sind unzuverlässig). Die 0,5 mg % Kreatininlösung ergab: D 52 %.

D. Feststellungen der optimalen Reaktionsbedingungen.

1. Das Mengenverhältnis der Reagenzien wurde, wie oben erwähnt, von der Methode von KOMM übernommen und für alle weiteren Untersuchungen beibehalten: Je 1 Teil m-Dinitrobenzoesäure und 10 % NaOH zu 2 Teilen Untersuchungsflüssigkeit.

2. Einhalten eines bestimmten pH. Die Farbreaktion geht nur in alkalischem Milieu vor sich. m-Dinitrobenzoesäure allein gibt mit Kreatininlösungen keine Farbe. Durch das Mengenverhältnis unserer Reagenzien ist das pH ohne weiteres gegeben. Bei den weiter unten beschriebenen Versuchen mit Blut werden wir aber sehen, dass die Einstellung auf ein bestimmtes pH von grosser Bedeutung ist (siehe Untersuchungen mit Blut).

E. Störungsfaktoren.

1. Abblassen der Farblösung. Wie LANGLEY und EVANS sowie KOMM, konnten auch wir feststellen, dass nach ca. 10 Minuten Stehenlassen die mit den Reagenzien gefärbte Lösung deutlich abblasst. Besonders ist dies der Fall, wenn man die Lösung grellem Licht oder gar der Sonne aussetzt. Andererseits muss man nach Hinzufügen der Reagenzien das Gemisch eine Weile stehen lassen. Nach unseren Beobachtungen tritt nach 3 Minuten Stehenlassen eine maximale Färbung ein. Aus diesem Grunde liessen wir bei allen unseren Versuchen die Lösungen 3 Minuten stehen, verdünnten dann auf ein bestimmtes Volumen und photometrierten. Die Zeit, die dabei verstreicht, ist maximal 6 Minuten, so dass mit dem Abblassungsfaktor nicht zu rechnen ist.

2. Eigenwert der Reagenzien. In alkoholischer Lösung hat m-Dinitrobenzoesäure keine Eigenfarbe. Durch Zugabe von NaOH entsteht aber eine Rotfärbung, die der Farbe bei der Kreatininreaktion nicht unähnlich ist. Für uns bedeutet das, dass wir bei jeder Kreatininreaktion noch eine Rotfärbung erhalten, die auf der Eigenfarbe der Reagenzien (NaOH und m-Dinitrobenzoesäure) beruht. Die Extinktion der Eigenfarbe kann von der Gesamt-Extinktion abgezogen werden, denn nach HEILMEYER addieren sich die einzelnen Extinktionen. Des weiteren stellte sich heraus, dass die Eigenreaktion der Reagenzien nicht dem LAMBERT-BEER'schen Gesetz folgt, das heisst: die Farbe nimmt nicht proportional zur Verdünnung der Lösung ab. Folgende Tabelle und die daraus resultierende Kurve beweisen das. Die Durchlässigkeitswerte und Extinktionswerte von Lösungen von m-Dinitro-

benzoesäure und 10% NaOH zu gleichen Teilen in Verdünnungen von 1:1 bis 1:10 sind zusammengestellt.

Verdünnung:						
1:1	=	1.5%	D	=	1.824	E
1:1.5	=	9.5%	D	=	1.022	E
1:2	=	25 %	D	=	0.602	E
1:2.5	=	39.6%	D	=	0.402	E
1:4	=	56.0%	D	=	0.252	E
1:5	=	67.6%	D	=	0.170	E
1:8	=	84.5%	D	=	0.073	E
1:10	=	86 %	D	=	0.066	E

Es dürfte sich bei dieser Eigenfärbung des Reagens-Gemisches um eine Eigenfarbe der m-Dinitrobenzoesäure handeln, die erst in alkalischer Lösung hervortritt (ähnlich wie bei Indikatoren). Die Extinktion folgt dem LAMBERT-BEER'schen Gesetz nicht, weil durch vermehrte Verdünnung eine Hydrolyse eintreten kann und durch andere Ionenkonzentrationen die Farbe sich ändert.

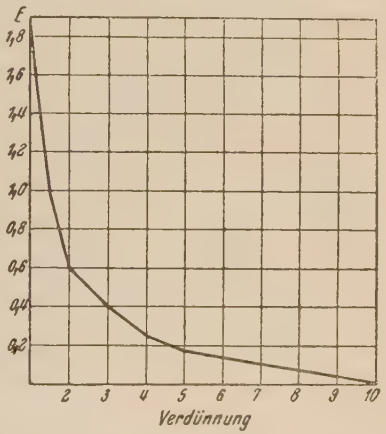

Abb. 2. Extinktionswerte des Leerversuches bei verschiedener Verdünnung der Reagenzien (E Extinktion, Abszisse = Verdünnungsgrad).

Aus diesen Beobachtungen ergeben sich für die weiteren Untersuchungen einige Folgerungen:

a) Bei jeder Kreatininbestimmung muss ein gewisser Blindwert der Reagenzien abgezogen werden.

b) Der Blindwert ist nicht immer derselbe und muss auf jeden Fall bei der Herstellung einer neuen Reagenslösung bestimmt werden.

c) Bei Verdünnungen kommt es nicht nur darauf an, wie oft man die Lösung in der man das Kreatinin bestimmt verdünnt, sondern wie oft man das Reagens verdünnt, weil die Reaktion nicht dem LAMBERT-BEER'schen Gesetz folgt.

Der Blindwert ist also für die entsprechende Verdünnung zu bestimmen und vom Gesamtwert abzuziehen.

F. Eichkurve.

Die mittels des Zeiss-Pulfrich-Photometers ermittelten Extinktionswerte einer Reihe reiner Kreatininlösungen bekannter Konzentration sollen in einer Kurve eingetragen werden. Diese Kurve soll uns gestatten, später in Lösungen mit unbekannter Kreatinin-Konzentration durch die erhaltenen Extinktionswerte den Kreatinin-Gehalt in mg% abzulesen. Zur Herstellung der Lösungen benutzten wir:

Kreatinin-Chlorhydrat-Roche in wässriger Lösung,
2% m-Dinitrobenzoesäure in 96% Alkohol,
10% Natronlauge.

Die Reaktion wurde immer folgendermaßen gemacht: 10 ccm Kreatinin-Lösung wurden in einem 50 ccm-Meßkolben mit 5 ccm 2% m-Dinitrobenzoesäure versetzt, geschüttelt, dann 5 ccm 10% NaOH zugegeben, 3 Minuten stehen gelassen, mit dest. Wasser auf 50 ccm aufgefüllt und sofort photometriert.

Es wurden 20 Kreatininlösungen hergestellt mit Konzentrationen von 0.5—10.0 mg% bei einem jeweiligen Intervall von 0.5 mg%. Die Ergebnisse sind in folgender Tabelle zusammengestellt:

0.5	mg% Kreatinin	52.0% D	= E	0.284
1.0		48.3		9.314
1.5		43.3		0.962
2.0		41.3		0.385
2.5		38.0		0.420
3.0		35.2		0.454
3.5		32.0		0.495
4.0		31.3		0.506
4.5		28.3		0.550
5.0		25.8		0.588
5.5		24.0		0.620
6.0		21.7		0.665
6.5		20.2		0.695
7.0		18.8		0.726
7.5		17.3		0.762
8.0		15.7		0.804
8.5		15.0		0.824
9.0		13.5		0.870
9.5		12.6		0.895
10.0		11.7		0.932

Diese Werte kurvenmäßig eingetragen ergeben eine Gerade, d. h. die Reaktion folgt streng dem LAMBERT-BEER'schen Gesetz. Zieht man von allen diesen Resultaten den Eigenwert der Reagenzien ab (er betrug bei 5-facher Verdünnung E 0.245), so erhält man eine parallele Kurve vom Nullpunkt des Koordinatensystems ausgehend, die eigentliche Eichkurve. Mit neuer m-Dinitrobenzoesäure von Schucharat, Görlitz wurden Kontrollversuche mit einzelnen Konzentrationen gemacht, die Punkte fielen auf die entsprechenden Punkte der Kurve, obschon der Eigenwert der Reagenzien kleiner war (E 0.170). Da unsere Lösungen 5-fach verdünnt sind (10 ccm Lösung wurden auf 50 ccm verdünnt), die Schichtdicke der Cuvette aber 5 cm ist, erhalten wir ohne Umrechnung eine Kurve, die auf theoretisch unverdünnte Lösungen und 1 cm Schichtdicke geeicht ist.

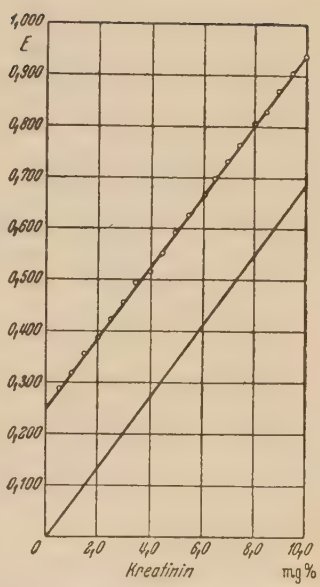

Abb. 3. Eichgerade. (Dünne Linie mit Punkten = effektiv aufgenommene Eichkurve, dicke Linie = wahre Eichgerade nach Subtraktion des Leerwertes.)

Die Fehlerquelle liegt zwischen 0.1—0.2 mg%, herrührend von Ablesungsfehlern. Auch bei guter Uebung im Photometrieren dürfte man nicht unter eine Grenze von 0.1 mg% kommen.

II. Versuche mit Urin.

A. Prinzipielles.

Da die Kreatininwerte im Urin höher zu erwarten sind als die Werte, die wir mittels unserer Eichkurve ablesen können, wurde eine 10-fache Verdünnung des Urins angewandt. D. h. 10 ccm Urin wurden auf 100 ccm mit Ac. dest. verdünnt. Davon wurden 10 ccm genommen, die gewöhnliche

Farbreaktion gemacht, nachher aber anstatt auf 50 ccm auf 100 ccm verdünnt. Das Reagens-Gemisch wird also 10-fach verdünnt. Daraus ergibt sich, dass wir einen Eigenwert der Reagenzien abziehen müssen, wie er bei 10-facher Verdünnung auftritt, nach unserer Tabelle wären es z. B. E 0.066, anstatt E 0.170 wie bei 5-facher Verdünnung. Ferner müssen wir das Resultat mit 20 multiplizieren, da die Verdünnung 20 mal grösser ist, als die, worauf unsere Eichkurve eingestellt ist.

B. Zusatzversuche.

Um einen Beweis zu haben, dass die Methode richtig ist und dass bei den vorausgehenden Behandlungen des Urins kein Kreatinin verloren geht, wurden viele Zusatzversuche gemacht. Es wurde zuerst der Urin untersucht, dann der gleiche Urin, der eine bekannte Menge Kreatinin zusätzlich enthielt.

Beispiel:

1. Urin: 30 ccm Urin + 20 ccm Aq. dest.
2. Urin: 30 ccm Urin + 20 ccm 50 mg% Kreatininlösung.

Der 2. Urin enthält somit 20 mg% mehr Kreatinin als der erste. Ist die Methode richtig, so muss diese Differenz bei der Bestimmung gemessen werden können.

C. Vorbehandlung des Urins.

Als störende Faktoren können auftreten: die Eigenfarbe des Urins und im Urin enthaltene Oxalate etc., die dann bei alkalischer Reaktion ausfallen könnten.

I. Entfärbung. KOMM und LEINBROCK wandten die Entfärbung des Urins mit Bleiacetat an. Nach Zusatz von Bleiacetat wurde der Urin filtriert, mit einigen Tropfen Bleiacetat die vollständige Ausfällung kontrolliert, das überschüssige Bleiacetat mit 5% Schwefelsäure ausgefällt, filtriert, mit einigen Tropfen Schwefelsäure wieder die vollständige Fällung kontrolliert, hernach mit 10% NaOH neutralisiert. Mit dieser Methode erhielten wir sehr unsichere Resultate, da sich beim Neutralisieren oder aber auch beim Hinzufügen der m-Dinitrobenzoesäure oft Trübungen einstellten, die natürlich eine

genaue photometrische Bestimmung verunmöglichten. Die Trübungen dürften aufgetreten sein durch ungenügendes Entfernen des Bleiacetates, das dann bei alk. Reaktion wieder ausfällt.

Gelang es uns aber zufällig ohne Trübung eine Bestimmung zu machen, so erhielten wir sehr gute Resultate bei Zusatzversuchen, so dass also die Bestimmung mit dieser Entfärbung durchaus möglich ist. Entfärbungen mit Carbo medicinalis erwiesen sich als unmöglich, da bei dieser Methode auch ca. 25% des Kreatinins mitabsorbiert werden.

2. Versuche ohne Harnentfärbung. Wir stellten uns die Frage: Hat die Eigenfarbe des Urins überhaupt einen Einfluß auf unsere Bestimmung? Zu diesem Zwecke wurde 100-fach verdünnter Urin gegen dest. Wasser photometriert. Die Messung ergab keine messbare Verringerung der Durchlässigkeit beim verdünnten Urin. Sehr günstig ist hierbei natürlich, dass wir mit einem Grünfilter arbeiten können, der eben die noch minime gelbliche Farbe nicht messbar absorbiert. — Es ist klar, dass sehr dunkle Urine, wie sie z. B. bei Ikterus vorkommen, eine messbare Eigenfarbe auch noch bei 100-facher Verdünnung aufweisen. So wurde z. B. beim Urin eines stark ikterischen Patienten bei 100-facher Verdünnung eine Extinktion von 0.161 festgestellt. In diesen Fällen können wir aber einfach die Eigenfarbe des Urins abziehen, oder direkt gegen 100-fach verdünnten Urin anstatt gegen dest. Wasser photometrieren. Denn nach HEILMEYER addieren sich die Extinktionen einzelner Farben linear, sofern sie nicht miteinander chemisch reagieren: $E_f = E_1 - E_2$. Somit dürfte sich eine Entfärbung des Urines in allen Fällen erübrigen, was natürlich die Bestimmung wesentlich vereinfacht und sicher auch die Fehlerquellen vermindert.

Wir gingen nun so vor, dass wir eine bestimmte Menge Urin zuerst aufkochten, nach Abkühlen auf Zimmertemparatur mit Aq. dest. wieder auf das ursprüngliche Volumen brachten, filtrierten und nachher die genannten Verdünnungen und

Reaktion vornahmen. Auf diese Weise erhielten wir gute Resultate:

Zusatzversuche von 20 mg% ergaben z. B.:

1.	Harn ohne Zusatz	140 mg% Kreatinin	
	Harn mit Zusatz	160 mg% Kreatinin	= Differenz 20 mg%
2.		148 mg% „	
		126 mg% „	= Differenz 22 mg%
3.		206 mg% „	
		224 mg% „	= Differenz 18 mg%
4.		33 mg% „	
		56 mg% „	= Differenz 23 mg%

III. Versuche mit Blut.

A. Prinzipielles.

Für alle unsere Untersuchungen verwendeten wir Plasma, denn Glomeruluspunktionen an Froschnieren ergaben, dass die Kreatininkonzentrationen im Glomerulusharn mit denjenigen im Blutplasma übereinstimmen (das ist für uns maßgebend, denn unsere Kreatininbestimmungsmethode soll später hauptsächlich zur Bestimmung des REHBERGschen Testes verwendet werden). Ferner ist es (wie eingangs erwähnt) wichtig, erythrocytenfreies Plasma zu verwenden, da in den Erythrocyten nicht-Kreatinin-artige Substanzen enthalten sind, die die Kreatininreaktion geben.

Um diese Forderungen zu erfüllen, gingen wir folgendermaßen vor: Zentrifugengläser wurden mit Paraffin ausgekleidet und nachher mit feinem Kaliumoxolat dünn ausgestreut. Nach dem Zentrifugieren erhielten wir so ein weitgehend unhämolysiertes, nicht gerinnbares Plasma.

B. Enteiweißung des Plasmas.

Für die Enteiweißung des Plasmas kam für uns von vornherein eigentlich nur die Trichloressigsäure in Frage, denn nur auf diese Art ist es möglich, eine Enteiweißung mit minimer Verdünnung des Plasmas zu erhalten. Gleiche Teile Plasma und 10% Trichloressigsäure wurden unter Schütteln zusammengebracht und nach 6 Minuten filtriert. So erhielten wir eine nur 2-fache Verdünnung des Plasmas, und das ist zur Bestimmung des kleinen endogenen Kreatinin-

gehaltes des Blutes sehr wichtig. Das erhaltene Filtrat ist wasserklar und zeigt beim Photometrieren keine erhöhte Extinktion gegenüber dest. Wasser, sein Leerwert ist also Null.

Ferner sei noch erwähnt, dass die Trichloressigsäure die Kreatininbestimmung in keiner Weise stört: 5 ccm Kreatininlösung von 5 mg% wurden mit 5 ccm 10% Trichloressigsäure versetzt, mit 10% NaOH neutralisiert und nachher die gewöhnliche Bestimmung vorgenommen. Sie ergab 2.4 mg%.

C. Einstellung auf ein bestimmtes pH.

Wie schon erwähnt, geht die Farbreaktion nur in alkalischem Milieu vor sich. Deshalb ist es klar, dass wir das durch die Trichloressigsäure sauer gewordene Filtrat neutralisieren müssen. Zuerst gingen wir so vor, dass wir das Filtrat in zwei gleiche Hälften teilten. In die eine Hälfte wurde ein Tropfen Neutralrot gebracht und dann tropfenweise so lange 10% NaOH zugegeben, bis die Farbe in Gelb umschlug (ungefähr bei pH 7). Nachher neutralisierten wir so, dass wir immer einen Tropfen Filtrat mittels eines Glasstabes auf Universalindikatorpapier Merck brachten und so das pH, das wir wünschten, herstellten. Die Bestimmung auf diese Art ist viel einfacher, und zudem kann Plasma gespart werden, da wir das Filtrat nicht in zwei Hälften teilen müssen resp. nur mit der einen Menge auskommen.

Nun erachten wir es aber nicht als günstig, das Filtrat, wie es in der Methode von KOMM angegeben ist, einfach zu neutralisieren, d. h. auf ein pH von 7 zu bringen. Denn es hat sich gezeigt, dass sehr oft beim Neutralisieren eine milchige Trübung auftritt. Sie ensteht nicht immer beim genau gleichen pH. Sie kann z. B. bei pH 7 noch vollständig fehlen, dafür aber beim Zusetzen von m-Dinitrobenzoesäure plötzlich erscheinen. Die Trübung dürfte wohl durch nicht vollständiges Fällen allen Eiweisses zustande kommen, anders können wir sie nicht erklären. Es ist klar, dass wir einen solchen unsicheren Faktor nicht in unserer Methode belassen können, denn trübe Lösungen ergeben einen vollkommen falschen Extinktionswert, andrerseits ist ein quantitatives Filtrieren für eine klinische Untersuchungsmethode zu umständlich.

Wir sind nun so vorgegangen, dass wir diese Trübung in jedem Falle provozieren. Dies ist möglich, indem wir das Filtrat auf ein pH von 8 bringen; in diesem Milieu erhalten

wir in jedem Falle die oben erwähnte Trübung. Es braucht dazu mit grosser Konstanz 0.8—1.0 ccm 10% NaOH. Die trübe Lösung wird nach ca. 1 Minute Stehenlassen filtriert. Vom wasserklaren Filtrat nehmen wir (um eine quantitative Filtration zu umgehen) die Hälfte des ursprünglichen Filtratvolumens + die Hälfte der zur Neutralisation verbrauchten NaOH. Wir versetzen z. B. 10 ccm vom enteiweissten Filtrat mit 1.0 ccm NaOH, filtrieren und nehmen vom Filtrat 5 ccm + 0.5 ccm, total also 5.5 ccm. Diese Menge bringen wir in einen 25 ccm Messkolben, versetzen sie mit 2.5 ccm m-Dinitrobenzoesäure, schütteln und geben 2.5 ccm 10% NaOH dazu, füllen nach 3 Minuten mit Aq. dest. auf 25 ccm auf und photometrieren sofort.

D. Zusatzversuche.

Auch bei den Untersuchungen mit Blut machten wir zur Stützung der Methode eine Anzahl Zusatz-Versuche. Gelang es uns anfangs, die Bestimmung ohne Trübung vorzunehmen, so erhielten wir gute Resultate. Auf die Art aber, wie sie zuletzt beschrieben wurde, waren die Zusatzversuche stets sehr zufriedenstellend, d. h. wir erhielten immer Werte, die die eingangs erwähnte Fehlergrenze von 0.1—0.2 mg% nicht übersteigen:

Zusatzversuche mit 2,5 mg% Kreatinin ergaben:

1. Plasma	ohne Zusatz	0.4 mg%		
„	mit „	3.0 mg%	Differenz =	2.6 mg%
2. Plasma	ohne Zusatz	0.8 mg%		
„	mit „	3.2 mg%	Differenz =	2.4 mg%
3. Plasma	ohne Zusatz	0.55 mg%		
„	mit „	3.0 mg%	Differenz =	2.45 mg%

IV. Praktische Ausführung der Kreatinin-Bestimmung in Blut und Urin.

A. Bestimmung im Blute.

12 ccm Plasma von unhämolysiertem Blut werden unter Umschütteln mit der gleichen Menge 10% Trichloressigsäure versetzt. Unter wiederholtem Durchmischen 6 Minuten stehen lassen. Dann wird filtriert. 10 ccm des wasserklaren Filtrates werden mit 10% NaOH (tropfenweise aus graduierter Bürette)

versetzt, bis zum pH von ca. 8. Das pH wird gemessen, indem man mittels eines Glasstabes einen Tropfen der Lösung auf Universalindikatorpapier Merck bringt. Mit großer Konstanz braucht man zur Alkalisierung 0.8—1.0 ccm 10% NaOH. Das alkalisierte Filtrat wird ca. 2 Minuten stehen gelassen, worauf sich eine milchige Trübung bildet. Filtrieren. 5 ccm des klaren Filtrates + ½ des Volumens der zur Alkalisierung gebrauchten NaOH (also meist 5.4—5.5 ccm Filtrat) werden in einem 25-ccm-Messkolben mit 2½ ccm 2% m-Dinitrobenzoesäure versetzt, geschüttelt und 2½ ccm 10% NaOH zugegeben. Das sich je nach Kreatinin-Gehalt mehr oder weniger intensiv rot färbende Gemisch wird 3 Minuten in abgedämpftem Licht stehen gelassen. Hernach mit dest. Wasser auf 25 ccm auffüllen und sofort in einer 5-cm-Cuvette im Zeiss-Pulfrich-Photometer gegen dest. Wasser photometriert.

Berechnung: Der abgelesene Wert von D% wird mittels der Tabelle auf die Extinction E umgerechnet. Von diesem Wert ist die E' (Extinction des Leerwertes der Reagenzien bei der betreffenden Verdünnung) abzuziehen. Aus dem reduzierten E wird an Hand der angefertigten Eichkurve der Kreatiningehalt abgelesen.

Die Eichkurve ist für unverdünnte Lösungen auf 1 ccm Schichtdicke geeicht. Das Plasma wird bei obiger Ausführung 10-fach verdünnt. Da in einer 5-ccm-Cuvette photometriert wird, ist die effektive Verdünnung noch eine zweifache, der abgelesene Kreatininwert muss infolgedessen mit 2 multipliziert werden.

Zur Berechnung des Leerwertes der Reagenzien werden 2½ ccm m-Dinitrobenzoesäure und 2½ ccm 10% NaOH in einen 25-ccm-Messkolben gegeben. Nach 3 Minuten Stehen lassen, auffüllen mit dest. Wasser auf 25 ccm und gegen dest. Wasser photometrieren. Der Leerwert bleibt konstant, muss aber bei Anfertigung einer neuen Lösung von m-Dinitrobenzoesäure immer wieder frisch bestimmt werden. E (ca. 0,15—0,17),

Beispiel:

Wir erhalten bei einer Ablesung:

D = 63.0%, entspricht E = 0.201

davon abzuziehen Leerwert bei 5-facher Verdünnung:

E 0.201

minus E 0.159

0.041 = 0.6 × 2 = 1.2 mg% Kreatinin

B. Bestimmung im Urin.

25 ccm, evtl. 50 ccm, Urin werden kurz aufgekocht und nach Abkühlung auf Zimmertemparatur wieder auf das ursprüngliche Volumen mit dest. Wasser aufgefüllt. Filtrieren. 10 ccm des Filtrates werden in einem 100-ccm-Messkolben mit dest. Wasser auf 100 ccm verdünnt. 10 ccm dieser verdünnten Lösung werden mit 5 ccm 2% m-Dinitrobenzoesäure versetzt, geschüttelt und 5 ccm 10% NaOH zugegeben. Nach 3 Minuten Stehenlassen in abgedämpftem Licht auffüllen auf 100 ccm mit dest. Wasser und sofort gegen dest. Wasser photometrieren.

(Bei hohen Harn-Kreatinin-Werten nimmt man nur 5 ccm, versetzt mit 2 ½ ccm m-Dinitrobenzoesäure und 2 ½ ccm 10% NaOH und füllt auf 100 ccm auf, weil zu hohe Konzentrationen im Photometer nicht mehr abgelesen werden können.)

Auch hier ist der Leerwert der Reagenzien abzuziehen! Er wird bestimmt, indem man 5 ccm beider Reagenzien zusammengibt, 3 Minuten stehen läßt, mit dest. Wasser auf 100 (resp. auf 200) auffüllt und gegen dest. Wasser photometriert. (E ca. 0.06 resp. 0.01).

Das reduzierte E wird an Hand der Eichkurve in Kreatinin umgerechnet. Da die Urinverdünnung eine 100-fache (resp. 200-fache) ist, muß der erhaltene Wert mit 20, resp. 40 multipliziert werden.

Beispiel:

Wir erhalten bei einer Ablesung:

D = 38,5% = E 0.415

minus E' 0.066

0.349 = 5.15 × 20 = 103.0 mg% Kreatinin.

V. Beispiele für Kreatinin-Clearance-Werte
bei Normalen und bei subakuten Nephritiden.

Nach der in der Einleitung erläuterten Formel wurden an einer Anzahl von Patienten Kreatinin-Clearance-Bestimmungen gemacht, deren Resultate in nachstehender Tabelle zusammengestellt sind.

Es wurden meist Doppelversuche angestellt (a, b).

P-Kr = Plasma-Kreatinin in mg%
U-Kr = Urin-Kreatinin in mg%
U/min. = pro Minute ausgeschiedener Urin in ccm
Clear. = Clearancewert in ccm
Rückresorpt. = Rückresorptionswert in ccm bzw. in %.

No.	Name	Diagnose		P-Kr	U-Kr	U/min.	Clear.	Rückresorpt.	
								in cm	in %
1	X. Y.	?	a)	1.1	130.0	0.72	85.0	84.3	97.9
			b)	1.1	275.0	0.38	95.0	94.6	99.5
2	H. P.	?	a)	1.0	62.5	2.31	144.4	142.1	98.6
			b)	1.1	122.0	1.26	140.0	138.7	99.0
3	F. H.	Multiple Sklerose	a)	1.7	63.0	4.12	152.6	148.5	97.3
			b)	1.8	97.0	2.47	133.2	130.7	97.1
4	Fr.	Asthma bronch.	a)	1.0	208.0	0.85	175.2	171.4	97.8
5	Bess	M. Cushing	a)	0.7	180.0	3.49	90.0	86.5	96.1
6	Ell	Abgeheiltes Lungeninfiltr.	a)	1.2	139.0	0.67	77.5	76.8	99.1
			b)	1.2	94.0	1.20	94.0	92.8	98.8
7	La	Stomatitis aphth.	a)	1.3	158.0	1.16	141.0	139.8	99.2
8	Scha	Paroxysmale Tachykardie	a)	1.5	230.0	1.30	199.3	198.0	99.4
			b)	1.3	295.0	0.70	158.9	158.2	99.7
9	Schä	Gallenblasen-Carzinom	a)	0.8	70.0	1.60	140.0	139.4	99.5
			b)	0.8	88.0	0.66	72.6	71.9	99.0
10	Gir	Echinococcus der Leber	a)	1.0	46.0	1.47	67.2	65.8	98.1
			b)	1.1	90.0	1.20	98.3	97.1	98.8
11	Vor	Subakute Nephritis	a)	2.0	165.0	1.00	82.5	81.5	98.7
			b)	— —	388.0	0.40	77.6	77.2	99.5
12	Berg	Subakute Nephritis	a)	1.7	75.0	2.31	101.9	99.6	98.0
			b)	— —	198.0	0.80	92.8	92.0	99.1
13	Neu	C-Hypovitamin.	a)	0.8	103.0	1.57	206.2	204.6	99.0
			b)	0.8	126.0	1.21	188.9	187.7	99.3
14	Nuss	C-Hypovitamin.	a)	1.6	128.0	1.05	84.0	82.95	98.8
			b)	— —	263.0	0.61	101.6	100.0	98.6
15	Am	Pleuritis sicca	a)	1.3	68.0	3.80	198.7	194.9	98.3
			b)	— —	98.0	2.40	181.2	178.8	98.6
16	Hän	Abgelaufene Gastroenter.	a)	0.8	38.0	2.60	123.5	120.9	98.0
			b)	— —	69.0	1.60	138.1	136.5	98.8
17	Ehr	Gastritis	a)	1.2	49.0	2.68	110.2	107.5	97.5
			b)	— —	46.0	2.13	81.6	79.5	97.5
18	Gür	Rheumatismus	a)	1.2	28.0	4.62	106.2	101.6	95.5
			b)	— —	50,0	3.64	151.4	147.8	97.5
19	Ger	Subakute Nephritis	a)	1.4	276.0	0.71	139.9	139.2	98.0
			b)	— —	496.0	0.49	173.5	173.0	99.7
20	Läd	Subakute Nephr.	a)	1.6	136.0	0.93	91.6	90.7	99.0

Zusammenfassung.

1. Wir stellten uns die Aufgabe, eine möglichst spezifische Kreatinin-Bestimmungsmethode für Blut und Urin auszuarbeiten, da die alte FOLINsche Methode mit Pikrinsäure nicht befriedigt. Auf Grund der Angaben von LANGLEY und EVANS machten KOMM und LEINBROCK kolorimetrische Bestimmungen mit m-Dinitrobenzoesäure: Enteiweißtes Plasma oder Urin geben mit gleichen Teilen m-Dinitrobenzoesäure und NaOH eine für Kreatinin typische Rotfärbung.
2. Diese Methode diente uns als Grundlage. Es mußten verschiedene Aenderungen vorgenommen werden: so mußte der Eigenfarbwert der Reagenzien, gewisse auftretende Trübungen usw. berücksichtigt, resp. eliminiert werden.
3. Zur genaueren und einfacheren Bestimmung wurde die Methode auf das Zeiß-Pulfrich'sche Stufenphotometer angewandt, bei einer Schichtdicke von 5 cm und Grünfilter s3. Mit Hilfe von reinen Kreatinin-Lösungen wurde eine Eichkurve angefertigt, an Hand welcher alle späteren Ablesungen vorgenommen wurden.
4. Die erzielten Resultate sind befriedigend, da wir bei Zusatzversuchen in Plasma und Urin gute Werte erhielten.
5. Als praktische Anwendung diente uns die Methode zur Bestimmung der Kreatinin-Clearance der menschlichen Niere, welche nach REHBERG, POPPER, MANDEL u. a. sogar dem Glomerulusfiltrat der Niere entsprechen soll:

Durchschnittliche Clearance-Werte bei Normalen:	135 ccm
— bei einigen subakuten Nephritiden:	103 ccm

Literatur.

Komm und Leinbrock: Med. Kl. II 1936 S. 1303
Riegert: Comptes rendues des Séances de la Société de Biologie 25/1939 S. 535
Ferro-Luzzi: Zeitschrift für die ges. exp. Medizin 96/1935 S. 250
Popper und Mandel: Biochem. Zeitschrift 291/1937 S. 354
Popper und Mandel: Ergebn. der inneren Med. und Kinderheilk. 53/1937 S. 685
Wilson, Langley and Evans: Journal of Biological Chemistry 115/1936 S. 333
Smith, Finkelstein and Smith: Journal of Biological Chemistry 135/1939 S. 231
Rehberg: Zbl. inn. Med. 52/1929 S. 589.